

#6

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1996年 7月17日

出願番号
Application Number:

平成 8年特許願第187763号

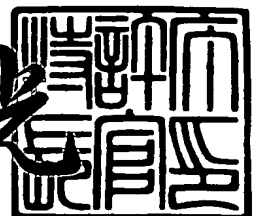
出願人
Applicant(s):

農林水産省農業生物資源研究所長

1996年11月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平08-3067028

【書類名】 特許願

【整理番号】 H061424

【提出日】 平成 8年 7月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 抗病原糸状菌植物とその作出方法

【請求項の数】 11

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2 農林水産省 農業
生物資源研究所内

【氏名】 光原 一郎

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2 農林水産省 農業
生物資源研究所内

【氏名】 大島 正弘

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2 農林水産省 農業
生物資源研究所内

【氏名】 大橋 祐子

【特許出願人】

【識別番号】 591127076

【氏名又は名称】 農林水産省農業生物資源研究所長 中川原 捷洋

【代理人】

【識別番号】 100078282

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 秀策

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 888888

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗病原糸状菌植物とその作出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗細菌性ペプチドをコードする遺伝子を有し、病原性糸状菌に抵抗性を有する植物。

【請求項2】 前記病原性糸状菌が、*Rhizoctonia solani*(キュウリ立ち枯れ病菌)、*Pythium aphanidermatum*(タバコ舞病菌)および*Phytophthora infestans*(疫病菌)である、請求項1に記載の植物。

【請求項3】 抗細菌性ペプチドが双翅目昆虫由来である、請求項1に記載の植物。

【請求項4】 前記双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドがSarcotoxin1aである請求項3に記載の植物。

【請求項5】 前記双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドをコードする遺伝子が、該遺伝子を有する組換え遺伝子、該組換え遺伝子と植物遺伝子プロモーターとが結合している発現カセット、および、該発現カセットと構成的に発現する植物プロモーターに連結された薬剤耐性遺伝子とから構成される発現ベクターからなる群から選択される形態で植物に導入された、請求項3に記載の植物。

【請求項6】 前記組換え遺伝子が、前記双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドをコードする遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子である、請求項5に記載の植物。

【請求項7】 前記Sarcotoxin1aが植物タンパク質のシグナル配列と結合している請求項5または6に記載の植物。

【請求項8】 前記植物遺伝子プロモーターが誘導性のタバコPR1a遺伝子のプロモーターである、請求項5に記載の植物。

【請求項9】 前記発現カセットがタバコPR1a遺伝子由来のターミネーターを有する、請求項5に記載の植物。

【請求項10】 前記発現ベクターが、さらにT-DNA領域と薬剤耐性遺伝子とを有する、請求項9に記載の植物。

【請求項11】 前記薬剤耐性遺伝子がカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターで発現される、請求項10に記載の植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本願発明は、双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドをコードする遺伝子を有し、病原性糸状菌に抵抗性を有する植物に関する。

【0002】

【従来の技術】

植物に抗菌性ペプチドをコードする遺伝子を導入し、細菌に対して抵抗性を与える研究がなされている。特に、双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドである *Sarcotoxin1a* (特開平7-250685)が発現し、抗菌性を有するようになったことが開示されている。しかし、抗病原性糸状菌に対して耐性を有する双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドを有し、かつ、抗糸状菌耐性を有する植物はいまだかつて知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本願発明は上記の問題を解決するためのものであり、その目的とするところは、外来タンパク質として、病原細菌耐性のタンパク質を用いることにより、病原性糸状菌に対して抵抗性のある植物を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本願発明は抗菌性ペプチドをコードする遺伝子を有し、病原性糸状菌に抵抗性を有する植物に関する。

【0005】

好適な実施態様においては、前記病原性糸状菌は、*Rhizoctonia solani*(キュウリ立ち枯れ病菌)、*Pythium aphanidermatum*(タバコ舞病菌)および*Phytophthora infestans*(疫病菌)である。

【0006】

好適な実施態様においては、抗細菌性ペプチドが双翅目昆虫由来である。

【0007】

好適な実施態様においては、前記双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドがSarcotoxin 1 aである。

【0008】

好適な実施態様においては、前記双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドをコードする遺伝子が、該遺伝子を有する組換え遺伝子、該組換え遺伝子と植物遺伝子プロモーターとが結合している発現カセット、および、該発現カセットと構成的に発現する植物プロモーターに連結された薬剤耐性遺伝子とから構成される発現ベクターからなる群から選択される形態で植物に導入されている。

【0009】

好適な実施態様においては、前記組換え遺伝子が、前記双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドをコードする遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子である。

【0010】

好適な実施態様においては、前記Sarcotoxin 1 aが植物タンパク質のシグナル配列と結合している。

【0011】

好適な実施態様においては、前記植物遺伝子プロモーターが誘導性のタバコPR1a遺伝子のプロモーターである。

【0012】

好適な実施態様においては、前記発現カセットがタバコPR1a遺伝子由来のターミネーターを有している。

【0013】

好適な実施態様においては、前記発現ベクターが、さらにT-DNA領域と薬剤耐性遺伝子とを有している。

【0014】

好適な実施態様においては、前記薬剤耐性遺伝子がカリフラワーモザイクウィ

ルス35Sプロモーターで発現される。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本願発明を詳しく説明する。

【0016】

本願明細書で使用する用語「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。特に好ましい植物として、タバコ、柑橘類、白菜、レタス、モモ、イネ、ジャガイモ、トマト、オオムギ、コムギおよびリンゴが挙げられる。

【0017】

本願明細書で使用する用語「植物遺伝子プロモーター」は、植物で発現する公知のプロモーターを意味する。例えば、タバコの感染特異的タンパク質PR1aのプロモーター（以下、タバコPR1aプロモーターという）などのある種のストレスにより発現が誘導されるプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（以下、CaMV35Sプロモーターという）、ノパリン合成酵素のプロモーター等が挙げられるがこれらに限定されない。高発現のためにはエンハンサーが用いられ得る。エンハンサーとしては、上記35Sプロモーター上流の配列を含むエンハンサー領域が好適である。エンハンサーは複数個用いられ得る。

【0018】

本願明細書で使用する用語「植物遺伝子」は、植物が有する遺伝子を意味する。植物遺伝子としては、いずれの遺伝子も使用され得る。好適にはタバコの感染特異的タンパク質PR1a遺伝子が挙げられるが、これに限定されない。

【0019】

本願明細書で使用する用語「タバコキチナーゼのhinge領域」とは、タバコのキチナーゼタンパク質中で異なる機能領域(キチン結合領域と触媒領域)を隔てている領域をいう。H.Shinshi ら、Plant Mole. Biol. 14巻、357-368(1990)を参照のこと。植物遺伝子と外来遺伝子との連結部分にタバコキチナーゼのhinge領域が存在することにより、各々のタンパク質の立体障害を避け得ることが期待される。

【0020】

本願明細書で使用する用語「外来遺伝子」とは、宿主植物にとって異種のタンパク質をコードする遺伝子をいう。植物遺伝子、バクテリア、酵母などの微生物の遺伝子、昆虫の遺伝子、動物の遺伝子などが好適に用いられ得る。耐病性植物を育種する場合等には、抗菌性ペプチドが外来性遺伝子として用いられ得る。

【0021】

例えば、双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドをコードする遺伝子をいうが、これに限定されない。双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドとしては、センチニクバエに由来するSarcotoxin 1 a、ザーペシン、または抗真菌タンパクが好ましいが、これらに限定されない。発現カセットに導入する外来遺伝子にはシグナル配列が付加され得、これにより生じる融合タンパク質は分泌され得る。

【0022】

Sarcotoxin 1 a の遺伝子配列は、Biochem.J. 239巻 717頁 (1986)に記載されている。

【0023】

本願発明の、外来遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子の作成には、公知の遺伝子組換え技術が使用され得る。

【0024】

本願明細書で使用する用語「発現カセット」とは、上記組換え遺伝子が発現し得るように、上記組換え遺伝子とその発現を調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の調節エレメントとが宿主細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。発現カセットは常法に従って構築され得る。適切なプロモーター、例えば、タバコPR1aプロモーターを、上記組換え遺伝子に結合させる。タバコPR1aプロモーターは、誘導性でかつ発現量の高いプロモーターとして知られている。さらに好適には、ターミネーターを上記組換え遺伝子に結合させ得る。

【0025】

本願明細書で使用する用語「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配

列の付加に關与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に關与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。ターミネーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス35Sターミネーター、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター、タバコPR1a遺伝子のターミネーターが挙げられるが、これに限定されない。タバコのPR1a遺伝子のターミネーターは遺伝子の発現効率を高めることが確認されている。

【0026】

本願明細書で使用する用語「発現ベクター」とは、上記発現カセットを宿主細胞中に伝達する媒体をいう。発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。本願発明の発現ベクターはさらにT-DNA領域と薬剤耐性遺伝子とを有し得る。

【0027】

薬剤耐性遺伝子としては、形質転換植物の選抜が容易であることが望ましい。薬剤耐性遺伝子としては、ネオマイシンフォスフォトランスフェレース (NPT) 遺伝子、ハイグロマイシンフォスフォトランスフェレース遺伝子等が好適に用いられ得る。

【0028】

薬剤耐性遺伝子を発現させるプロモーターとしては、上記植物遺伝子プロモーター、例えばタバコPR1aプロモーター、CaMV35Sプロモーター、ノパリン合成プロモーター等が挙げられるがこれらに限定されない。好適には、構成的に高発現するCaMV35Sプロモーターが使用され得る。上記発現カセットに外来遺伝子を発現させるプロモーターとして誘導性のタバコPR1aプロモーターを用いると、このCaMV35Sプロモーターによって、この誘導性のPR1aプロモーターが構成的に発現され、かつ、サリチル酸あるいは病原体感染に伴う壊死病斑形成によって、PR1aプロモーター発現量が増大される。これは、CaMV35SプロモーターとPR1aプロモーターとが隣り合って存在するため、PR1aプロモーターの性質が35Sプロモーター上にあるシスエレメントの影響を受けるからと考えられる。

【0029】

発現ベクターの構築に用いるベクターとしては、pBI系のベクター、pUC系のベ

クターあるいはpTRA系のベクターが好適に用いられ得る。pBI系のベクターはバイナリーベクター系あるいは中間ベクター系のようなアグロバクテリウムを介して植物に発現カセットを導入し得る。例えば、pBI121、pBI101、pBI101.2、pBI101.3等が挙げられる。pUC系のベクターは、直接植物に発現カセットを導入し得る。例えば、pUC18、pUC19、pUC9などが挙げられる。本願では、pTRA系(Ohshimaら、Plant Cell 2巻、95-106頁(1990))のバイナリーベクターが好適に用いられ得る。この発現ベクターは、植物に導入され得る領域(T-領域)に融合遺伝子を含む発現カセットと、マーカー遺伝子としてCaMV35Sプロモーターの支配下で発現されるNPT遺伝子を含んでいる。

【0030】

本願発明の発現ベクターがT-領域を有する場合、そのT-領域構造に：

(1) アグロバクテリウムから植物に移行する際に、導入を意図する外来遺伝子が先に移行し、続いてマーカー遺伝子が移行する様にT-領域の右側に外来遺伝子を含む発現カセットが配置され得る。このため薬剤耐性によって選抜された形質転換植物は極めて高い確率で外来遺伝子を含み得る、および

(2) マーカー遺伝子の発現を支配するCaMV35Sプロモーターと外来遺伝子の発現を支配するPR1a遺伝子のプロモーターを隣り合わせに配置してある。このことにより、本来PR1aプロモーターを用いて外来遺伝子を植物に発現させた場合非誘導条件下では発現が殆ど見られないが、おそらくCaMV35Sプロモーターの影響により非誘導状態でも構成的な発現を示し、なおかつ誘導により高いレベルの発現を示すようになる、という特徴を有する。

【0031】

上記発現ベクターは、PR1aプロモーターを用いると、サリチル酸あるいは病原体感染に伴う壊死病斑形成によって誘導的に発現量が増大する。

【0032】

本願発明の発現ベクターは、当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作成され得る。

【0033】

特開平7-250685で記載されている、Sarcotoxin 1 aを発現するプラスミドPST1

0も本願発明に使用し得る。

【0034】

植物細胞への組換え遺伝子、発現カセット、あるいは発現ベクターの植物細胞への導入には、当業者に周知の方法が用いられ得る。

【0035】

上記得られた発現カセット、あるいは発現ベクターを細胞に導入するには、上記のようにアグロバクテリウムを介する方法と直接細胞に導入する方法とがある。

【0036】

アグロバクテリウムを介する方法は、例えば、Nagelらの方法(Micribiol. Lett., 67, 325(1990))が用いられ得る。この方法は、まず、例えば発現ベクターをエレクトロポレーションによってアグロバクテリウムに形質転換し、ついで、形質転換されたアグロバクテリウムをPlant Molecular Biology Manual (S. B. Gelvin et al., Academic Press Publishers) に記載の方法で植物細胞に導入する方法である。発現カセット、発現ベクターを直接細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、遺伝子銃法がある。

【0037】

発現カセット、発現ベクターを導入された細胞は、まずカナマイシン耐性等の薬剤耐性で選択され、ついで、常法により、植物体に再生され得る。

【0038】

形質転換された植物における外来遺伝子の発現の確認には、当業者に周知の方法が用いられ得る。例えば、形質転換された植物から可溶性のタンパク質を抽出し、Analytical Biochemistry 166, 368-379に記載のように、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で抽出した蛋白質を分離し、PVDF膜に転写した後、目的の蛋白質に対する抗体と反応させ、生じるバンドを免疫化学的に検出する事によって、発現が確認され得る。

【0039】

本願発明の双翅目昆虫由来の抗細菌性ペプチドをコードする遺伝子を形質転換された植物が、病原糸状菌に耐性を有し得るか否かは、植物体に再生された形質

転換植物およびコントロール植物を、それぞれ自家受粉させて得られる種子を薬剤耐性選抜の下で発芽させた幼植物を用いて決定され得る。この幼植物の生育する寒天培地上に病原菌を接種し、接種後適当な時間の経過後、緑色を示して生存している個体を抵抗性植物体と判定した。病原菌としては、*Fusarium oxysporum* F-3(ホウレンソウ萎凋菌)、*Rhizoctonia solani*(キュウリ苗立ち枯れ病菌)、*Rhizoctonia solani* AG-4 1272(ホウレンソウ株腐病菌)、および*Pythium aphanidermatum*(タバコ舞病菌)などが挙げられる。

【0040】

形質転換植物の病原糸状菌耐性の検定は、植物体に再生された形質転換植物およびコントロール植物の緑葉の表面に傷を付け、病原菌をすりつけることにより接種した後、一定期間後に淡褐色の病斑の大きさを評価することによっても行い得る。病原菌としては、*Phytophthora infestans*(疫病菌)、および*Botrytis cinerea*(灰色カビ病菌)などが挙げられる。

【0041】

試験管内でのSarcotoxin 1aの抗カビ実験は、Sarcotoxin 1aを含む検定培地に、病原菌を前培養して得られる菌そうを接種し、一定時間毎に透過光のもとで伸長する菌糸のサイズを計測して、その面積を標準偏差と共に計算することにより行い得る。

【0042】

【実施例】

以下実施例を挙げて本願発明を具体的に説明する。この実施例で使用した制限酵素、プラスミド等は宝酒造株式会社、東洋紡績株式会社等から入手可能である。

【0043】

(実施例1 組換え遺伝子および発現カセットの作成)

外来遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子を以下のように作成した。図1に基づいて説明する。

【0044】

(1) P+S PR1a断片 (PR1aプロモーターの一部とPR1a蛋白質のシグナルペプ

チドをコードする配列を有するDNA断片)の調製

図1に示すタバコPR1a遺伝子のゲノミッククローンを有するプラスミドpPR- γ (M. Oshimaら、FEBS Letters 255巻、243-246頁(1987))を鋳型として、PR1aプロモーター領域にあるXhoI部位からシグナルペプチドをコードしている領域までを増幅し、DNA断片(P+S PR1a断片)を得た。P+S PR1a断片は、配列番号1の配列を有するプライマーPPR1a51と配列番号2の配列を有するプライマーSPR1a31とをプライマーとして、Pfuポリメラーゼ(stratagene社製)を用いてPCRで得られた断片である。このPCRに用いたプライマーのうちSPR1a31はPR1a遺伝子のシグナルペプチドをコードする配列と相補的な配列を有しているが、図2に示すように、塩基が一部置換されている。この塩基の置換により制限酵素部位PstIが新たに導入されたが、コードするアミノ酸配列には変化がない。

【0045】

(2) TPR1a断片(PR1a遺伝子のターミネーター領域を有するDNA断片)の調製

図1のタバコPR1a遺伝子のゲノミッククローンを有するプラスミドpPR- γ を鋳型として、PR1a遺伝子のターミネーター領域を有するDNA断片(TPR1a断片)を得た。TPR1a断片は、配列番号3のプライマーTPR1a51および配列番号4のプライマーBKSBEを用いて、PR1aのターミネーター領域をPCRで増幅して得られたDNA断片である。このPCRに用いたプライマーのうち、TPR1a51は5'端にSarcotoxin 1aをコードするcDNAの3'端と相同な配列を有し、さらにその終止コドンの直後にSacIの認識配列を有する。また、終止コドン直前に、図3に示すように塩基が一部置換されている。この塩基の置換により制限酵素認識部位PmaCIが新たに導入されたが、コードするアミノ酸配列には変化がない。他方、プライマーBKSBEは、pPR- γ のベクター部分のEcoII部位からBamHI部位までと相同な配列を持つ。この部位はpPR- γ のPR1a遺伝子のターミネーターに相当する部分の3'端と隣接している。

【0046】

(3) HMPR1a断片(タバコのキチナーゼのhinge領域およびPR1aの成熟型タンパク質をコードする領域を有するDNA断片)の調製

図1のタバコPR1a遺伝子のゲノミッククローンを有するプラスミドpPR- γ を鋳

型として、PR1aの成熟型タンパク質をコードする領域を有するDNA断片(H MPR1a断片)を得た。H MPR1a断片は、配列番号5のプライマーHMPPR1a51および配列番号6のプライマーMPR1a31を用いて、PCRにより増幅された断片である。このPCRに用いたプライマーのうち、HMPR1a51は5' 端にTPR1a51のPmaCI部位およびその周辺の12塩基の配列と同一の配列を含み、さらにその3' 側にタバコのキチナーゼのhinge領域をコードする領域と同一の配列を有する。

【0047】

また、MPR1a31は3' 側の終止コドン直後に、制限酵素SacIの認識部位が付加されている。

【0048】

(4) MSARCO断片(Sarcotoxinの成熟型ペプチドをコードする領域を有するDNA断片)の調製

Sarcotoxin 1 a のcDNAを含む既知のプラスミドpT019(N. Matsumoto et al., BioChem. J., 239, 717(1986))を鋳型として、Sarcotoxinの成熟型ペプチドをコードする領域を有するDNA断片(MSARCO断片)を得た。このMSARCO断片は、配列番号7のプライマーMSARCO51および配列番号8のプライマーMSARCO31を用いてSarcotoxinの成熟型ペプチドをコードする領域をPCRにより増幅して得られたDNA断片である。プライマーMSARCO51およびMSARCO31の配列をそれぞれ図4および図5に示す。プライマーMSARCO51は5' 端付近にSPR1a31のPstI部位およびその周辺の14塩基と相補的な配列を持つ。MSARCO31は、図5に示すように終止コドンにコードする領域と相補的な配列周辺に制限酵素PmaCIおよびSacIの認識部位が導入されている。この制限酵素部位の導入は、TPR1a51と同様にして行った。

【0049】

(5) MSARCO-TPR断片(MSARCO断片とTPR1a断片とを連結したDNA断片)の調製
上記(4)で得られたMSARCO DNA断片と(2)で得られたTPR1a断片とを鋳型としてプライマーMSARCO31およびBKSBEを用いる組換えPCR法により増幅し、MSARCO-TPR断片を得た。

【0050】

(6) 組換え遺伝子の調製(P+S PR1a断片、H MPR1a断片およびMSARCO-TPR1a

断片の接続)

上記(1)で得られたP+S PR1a断片、(3)で得られたH MPR1a断片および(5)で得られた(2)と(4)との結合断片であるMSARCO-TPR1a断片を、それぞれ、プラスミドpUC18にクローニングし、それぞれ、pUC P+S PR1a、pUC H MPR1aおよびpUC MSARCO-TPR1aと命名した(図6を参照)。これらのプラスミドに目的の配列が正しく挿入されていることを、アプライドバイオシステム社製の塩基配列決定kitおよび塩基配列解析装置を用いて確認した。これらの、pUC18にクローニングされ塩基配列を確認したDNAを以後の遺伝子組換えの材料として用いた。配列番号7に、配列決定されたPR1aのターミネーター部分の塩基配列を示す。

【0051】

以下、図6を参照しながら本願発明の組換え遺伝子の作成を説明する。

【0052】

まず、プラスミドpPR- γ のPR1a遺伝子のプロモーター領域のXhoI部位より上流(5'側)部分を制限酵素EcoRIおよびXhoIで切断し、得られた約1.6kbの断片をBio101社製のGene Clean kitで精製した。他方、P+S PR1a断片をクローニングしたプラスミドpUC P+S PR1aをEcoRI-XhoIで切断し、その切断部位に、上記精製した約1.6kbの断片を挿入した。得られたプラスミド(pUC P+S PR(2.4))はインサートとして全長のPR1a遺伝子プロモーターおよびPR1a遺伝子のシグナル配列をコードするDNA領域を含む。このプラスミドはEcoRIで切り出される、タバコPR1aプロモーターのカセットを有している。

【0053】

pUC MSARCO-TPR1aを制限酵素PstIで切断し、MSARCO-TPR1aに相当するDNA断片を精製した。この断片を、pUC P+S PR(2.4)のPstI部位に挿入した。得られたプラスミドのうち挿入されたDNA配列が正しくP+S PR1a-MSARCO-TPR1aの方向に挿入されているプラスミド(pUC P+S PR(2.4) MSARCO-TPR1a)を選択した。このプラスミドは、EcoRIで切り出される、タバコPR1aプロモーターによって支配される、発現可能な非融合Saracotoxinをコードする遺伝子のカセット(カセットPSS)を有している。

【0054】

ついで、プラスミドpUC H MPR1aからH MPR1a部分を制限酵素PmaCI, SacIにより切り出した。他方、pUC P+S PR(2.4) MSARCO-TPR1aをPmaCI-SacIで切断し、その部位に切り出したH MPR1a部分を挿入した(pUC P+S PR1a(2.4) MSARCO H MPR1a TPR)。このプラスミドは、外来遺伝子として双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドであるSarcotoxin1 aの遺伝子と、植物遺伝子としてタバコPR1aタンパク質遺伝子とを、タバコキチナーゼのhinge領域を介して連結させた本願発明の組換え遺伝子を含有している。さらに、このプラスミドは、タバコPR1aプロモーターによって支配されるSarcotoxin1a-PR1a融合タンパク質をコードする組換え遺伝子を有しており、このプラスミドを、EcoRIで切断すると、タバコPR1aプロモーターによって支配される発現可能なSarcotoxin1a-hinge-PR1a融合タンパク質をコードする組換え遺伝子、P+S PR1a(2.4) MSARCO H MPR1a TPR、つまり、本願発明の組換え遺伝子を発現する発現カセット(カセットPSP)を有している。

【0055】

(実施例2 発現ベクターの構築)

バイナリーベクターpTRA415(図7)(Ohshimaら、Plant Cell 2巻、95-106頁(1990))は、BglIII-BglIII断片内に、CaMV35Sプロモーターの下流にNPT遺伝子が結合した配列を有する。特願平8-68809に記載される方法に従って、このpTRA415をBglIIIで切断し、ライゲース(ligase)によって再連結した後、大腸菌JM109に導入して、pTRA415のBglIII-BglIII断片が逆の方向に挿入されたプラスミド(pTRA415(R))を作製した。pTRA415(R)はT-領域内部にマーカー遺伝子としてCaMV35Sプロモーターで支配されるNPT遺伝子を有し、その右側にpTRA415(R)内で一箇所だけ切断する(ユニークな)制限酵素切断部位として、EcoRI部位を持つ。このEcoRI部位に外来遺伝子を導入した場合、この外来遺伝子が植物に移行した後にマーカー遺伝子が移行される。

【0056】

上記プラスミドpUC P+S PR1a(2.4) MSARCO TPR (非融合Sarcotoxinを発現するプラスミド)をEcoRIで切断し、カセットPSSを切り出し、pTRA415(R)のEcoRI部位に挿入した。得られたプラスミドから、挿入された発現カセットのPR1aプロモ-

ターがマーカー遺伝子のCaMV35Sプロモーターと隣接するように挿入されているものを選抜した(プラスミドPSS)。

【0057】

同様に、プラスミドpUC P+S PR1a(2.4) MSARCO H MPR1a TPR (融合Sarcotoxin-PR1aタンパク質を発現するプラスミド)をEcoRIで切断し、カセットPSPを切り出し、pTRA415(R)のEcoRI部位に挿入した。得られたプラスミドから、挿入された発現カセットのPR1aプロモーターがマーカー遺伝子のCaMV35Sプロモーターと隣接するように挿入されているものを選抜した(プラスミドPSP)。PSPおよびPSSのプラスミドの模式図を図8に示す。

【0058】

(実施例3 発現ベクターのタバコへの導入)

(1) *Agrobacterium tumefaciens*の形質転換

*Agrobacterium tumefaciens*を250 μ g/mlのストレプトマイシンと50 μ g/mlのリファンピシンを含む培地中、28℃で培養しNagelら(Micribiol. Lett., 67, 325(1990))の方法に従って、細胞培養液を調製し、発現ベクター(プラスミドPSP、およびプラスミドPSS)をエレクトロポレーションにより上記細菌に導入した。用いたPSPおよびPSSのプラスミドの模式図を図8に示す。

【0059】

(2) タバコの形質転換

上記方法でプラスミドPSPおよびプラスミドPSSで形質転換された*Agrobacterium*を得、YEB培地(DNA cloning第2巻78頁)で振とう培養した後、滅菌水で20倍に希釈し、タバコ(*Nicotiana tabacum* Samsun NN)の葉片を共存培養した。2～3日後、抗生物質を含む培地で上記細菌を除去し、2週間ごとに選択培地で継代し、形質転換したタバコ細胞を選抜し、定法により再分化した結果、独立した形質転換個体を得た。

【0060】

同様にして、プラスミドPSSで形質転換された形質転換個体を得た。

【0061】

(実施例4 形質転換植物におけるSarcotoxin 1a発現のウェスタンブロッテ

イングによる検出)

得られたPSPおよびPSSで形質転換されたタバコ形質転換植物からそれぞれ可溶性のタンパク質抽出液を調製した。タバコの葉から直径約7mmの葉片4枚を切り取りサリチル酸0.5mM水溶液上に、および対象として純水上に、浮遊させた状態で2日間培養した後、20μlの50mM Na-PO₄(pH7.0), 1mM Na-EDTA, 10μM A-PMSF, 0.5μg/ml Leupeptin, 2mM DTT中ですりつぶし、10,000rpmで10分間遠心を行い上清を回収しタンパク質抽出液とした。この抽出液のうち2.5μlをAnalytical Biochemistry 166, 368-379で示されているSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF膜に転写した後、抗Sarcotoxin抗体と反応するバンドを免疫化学的に検出した。これにより形質転換植物においてSarcotoxin遺伝子が発現し、Sarcotoxinが合成されていることを確認した。

【0062】

(実施例5 試験管内におけるSarcotoxin 1aの抗糸状菌活性の測定)

Fusarium oxysporum F-3(ハウレンソウ萎凋菌)、*Rhizoctonia solani*(キュウリ苗立ち枯れ病菌)、*Rhizoctonia solani* AG-4 1272(ハウレンソウ株腐病菌)に対する、Sarcotoxin 1aの抗糸状菌活性の測定を行った。

【0063】

Sarcotoxin 1aに抗糸状菌活性があること、およびその測定方法は知られていないので、まず前培養培地および検定用培地を種々検討した。前培養培地としては短期間で菌そうが均一に拡大するものを選択し、および検定用培地としてはできるだけ菌糸の伸長を抑え、確認しやすいものを選んだ。

【0064】

(1)検定用プレートの調製

検定用培地とした、以下の3種類の培地を用意した。

【0065】

(i) Czapek改変培地(1リットル当たり: 10g ショ糖、0.5g MgSO₄ · 7H₂O、2.0g NaNO₃、0.01g Fe₂(SO₄)₃、1.0g K₂HPO₄、0.5g KCl、15g アガロース、pH6.8~7.0; *Rhizoctonia solani* AG-4 1272(ハウレンソウ株腐病菌)で使用)、(ii) 5倍希釈PDA培地(1リットル当たり: 7.8g Bacto(登録商標)Poteto Dextrose Agar、

12g アガロース ; *Fusarium oxysporum* F-3(ホウレンソウ萎凋菌)で使用)、(iii) $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液(15g/l アガロース、pH5.8 ; *Rhizoctonia solani*(キュウリ苗立ち枯れ病菌で使用))。

【0066】

検定用培地をオートクレーブして、50℃以下に下がったところでSarcotoxin 1 a (ペプチド合成により合成し、HPLCにより、99%以上に精製した標品)を添加し、12ウェルマイクロプレートにウェル当たり400 μ lを注入して固化させた。最終のSarcotoxin 1 aの濃度は、図9～11に記載の通りである。

【0067】

(2)病原性糸状菌の接種

(a)前培養

Fusarium oxysporum F-3(ホウレンソウ萎凋菌)、*Rhizoctonia solani*(キュウリ苗立ち枯れ病菌)、*Rhizoctonia solani* AG-4 1272(ホウレンソウ株腐病菌)をPDA培地(39g/l Bacto(登録商標)Poteto Dextrose Agar)で2日間、22℃で前培養した。

【0068】

(b)病原糸状菌の接種

9 cmシャーレの培地表面にほぼ全面に広がった各菌糸の最も外側の菌そうを、直径4 mmのコルクボーラで打ち抜き、検定用プレートのウェルの中央に、菌そうの表面を下にしておいた。この検定用プレートを暗黒下、22℃で保温した。

【0069】

(c)抗糸状菌の検定

上記の病原糸状菌を接種した検定用プレートを、一定時間毎に、透過光のもとで伸長する菌糸のサイズを計測して、その面積を標準偏差と共に計算した(図9、図10、図11)。これらの図に示されるように、Sarcotoxin 1 aの抗カビ性は濃度依存性を示した。従って、Sarcotoxin 1 aが糸状菌に有効であると推察された。

【0070】

(実施例6 Sarcotoxin 1 a 遺伝子導入タバコにおける*Rhizoctonia solani*(キュウリ立ち枯れ病菌抵抗性))

PSPまたはPSSを有するアグロバクテリウムで形質転換した形質転換タバコ、および対照実験として35S-GUSを形質転換したタバコを自家受粉することにより得られた種子をカナマイシン50 μ g/mlを含む培地に播種し、20日経過した草丈約8mmの幼植物を使用した。MS寒天培地(Murashige,T.およびSkoog,F. (1962) A reversed medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15巻 473-497頁を参照)を含む直径9cmのシャーレにこの幼植物30本を均一に植えて、3日間置いた。次いでRhizoctonia solani(キュウリ立ち枯れ病菌)を前培養して得られる菌そうを3mm角に切り取り、シャーレ当たり7片を均等に寒天上に置くことにより菌を接種し、22℃に保温した。接種後6日目に緑色を示して生存している個体を抵抗性植物体とした。結果を表1に示す。

【0071】

【表1】

Sarcotoxin 1a遺伝子導入タバコで検出された
Rhizoctonia solani(キュウリ苗立ち枯れ病菌)抵抗性

植物	生存個数(健全個体数)
対照(35S-GUS)	2(0)
PSS12	1(1)
PSS41	8(7)
PSS42	1(1)
PSP115	4(2)
PSP121	2(0)
PSP137	2(0)

【0072】

PSPまたはPSSで形質転換された形質転換植物は、Rhizoctonia solani(キュウリ立ち枯れ病菌)に対して抵抗性を示した。表中の括弧内の数字は、抵抗性個体の中でも正常な緑色を示し、特に旺盛な生育を続けている個体数を示す。

【0073】

(実施例7 Sarcotoxin1 a遺伝子導入タバコにおけるPythium aphanidermatum(タバコ舞病菌)抵抗性)

PSPまたはPSSを有するアグロバクテリウムで形質転換した形質転換タバコ、および対照実験として35S-GUSを形質転換したタバコを自家受粉することにより得られた種子を、カナマイシン50 μ g/mlを含む培地に播種し、20日経過した草丈約8mmの幼植物を使用した。MS寒天培地を含む直径9cmのシャーレにこの幼植物30本を均一に植えて、1日間置いた。次いでPythium aphanidermatum(タバコ舞病菌)を前培養して得られる菌そうを3mm角に切り取り、シャーレ当たり7片を均等に寒天上に置くことにより菌を接種し、22℃に保温した。接種後14日目に緑色を示して生存している個体を抵抗性植物体とした。結果を表2に示す。

【0074】

【表2】

Sarcotoxin1 a遺伝子導入タバコで検出された
Pythium aphanidermatum(タバコ舞病菌)抵抗性

植物	生存個数(健全個体数)
対照(35S-GUS)	9(0)
PSS12	6(3)
PSS41	23(15)
PSS42	12(1)
PSP115	9(1)
PSP121	9(0)
PSP137	7(0)

【0075】

PSPまたはPSSで形質転換された形質転換植物は、Pythium aphanidermatum(タバコ舞病菌)に対して抵抗性を示した。表中の括弧内の数字は、抵抗性個体の中でも正常な緑色を示し、特に旺盛な生育を続けている個体数を示す。

【0076】

(実施例8 Sarcotoxin1 a 遺伝子導入タバコにおける*Phytophthora infestans*(疫病菌)抵抗性)

PSPまたはPSSを有する形質転換当代の植物およびコントロール植物の葉の表面の6箇所に、それぞれ小葉匙の背(幅6mm程度のステンレス板状)でこすることにより傷を付けた。前培養した*Phytophthora infestans*(疫病菌)の菌そうが広がった平板培地を約3mm角の大きさに切ったものを傷を付けた部位に置き、これを小葉匙でこすりつけることによって菌を接種した。一定期間後にそれぞれの接種部位の病徴(褐色病斑の大きさ)の程度を調査し、6箇所の合計をもってその植物の病徴指数とした。

【0077】

病斑の評価を以下の数字で表した。

【0078】

0 病斑は見られない。

【0079】

1 直径が5mm以下の褐色の病斑あり。

【0080】

2 直径が5mm-10mmの褐色の病斑あり。

【0081】

3 直径が10mm-20mmの褐色の病斑あり。

【0082】

4 直径が20mm以上の褐色の病斑あり。

【0083】

このとき高い抵抗性を示した形質転換タバコ6個体、およびコントロール植物の結果をそれぞれ図12に示す。Sarcotoxin1 a 遺伝子が導入された植物の中から*Phytophthora infestans*(疫病菌)による感染に高い抵抗性を示すものが得られた。特に、PSS植物においては全く病徴を示さないものが2個体見られた。

【0084】

【発明の効果】

植物に抗細菌性ペプチドをコードする遺伝子を導入することにより、抗細菌性のみならず、病原性糸状菌に対しても耐性を有する植物の提供が可能となった。

【0085】

【配列表】

【0086】

【配列番号：1】

配列の長さ：32

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列

AGTAGAATTC TTAAAACACC CTCGAGGATT TC

32

【0087】

【配列番号：2】

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

GGGCTCTGCA GGAGTGGGAT ATT

23

【0088】

【配列番号：3】

配列の長さ：43

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

ACAGCACGTG GTTAATTGAG CTCGAAACGA CCTACGTCCA TTC

43

【0089】

【配列番号：4】

配列の長さ：21

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

TCCCCCGGGC TGCAGGAATT C

21

【0090】

【配列番号：5】

配列の長さ：72

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

TACACACGTG GTCCCACACC TACACCCCCC ACCCCACCCG GTGGTGGGCA AAATTCTCAA
CAAGACTATT TG

72

【0091】

【配列番号：6】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

TATCGAGCTC AATTAGTATG GACTTTCGCC

30

【0092】

【配列番号：7】

配列の長さ：36

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

CACTCCTGCA GAGCCGGTTG GTTGAAAAAG ATTGGC

36

【0093】

【配列番号：8】

配列の長さ：33

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

TTTCGAGCTC AATTAACCAC GTGCTGTAGC AGC

33

【図面の簡単な説明】

【図1】 タバコPR1a遺伝子のゲノミッククローンを有するプラスミドpPR- γ を示す図である。

【図2】 プライマーSPR1a31の置換された配列を示す図である。

【図3】 プライマーTPR1a51の置換された配列を示す図である。

【図4】 プライマーMSARC051の配列を示す図である。

【図5】 プライマーMSARC031の置換された配列を示す図である。

【図6】 本願発明の組換え遺伝子の作成を説明する図である。

【図7】 バイナリーベクターpTRA415およびpTRA415(R)を示す図である。

【図8】 本願発明に用いた各プラスミドPSP、PSSを示す図である。

【図9】 試験管内におけるSarcotoxin 1aの抗-Fusarium oxysporum F-3(抗ホウレンソウ萎凋菌)試験の結果を示す。

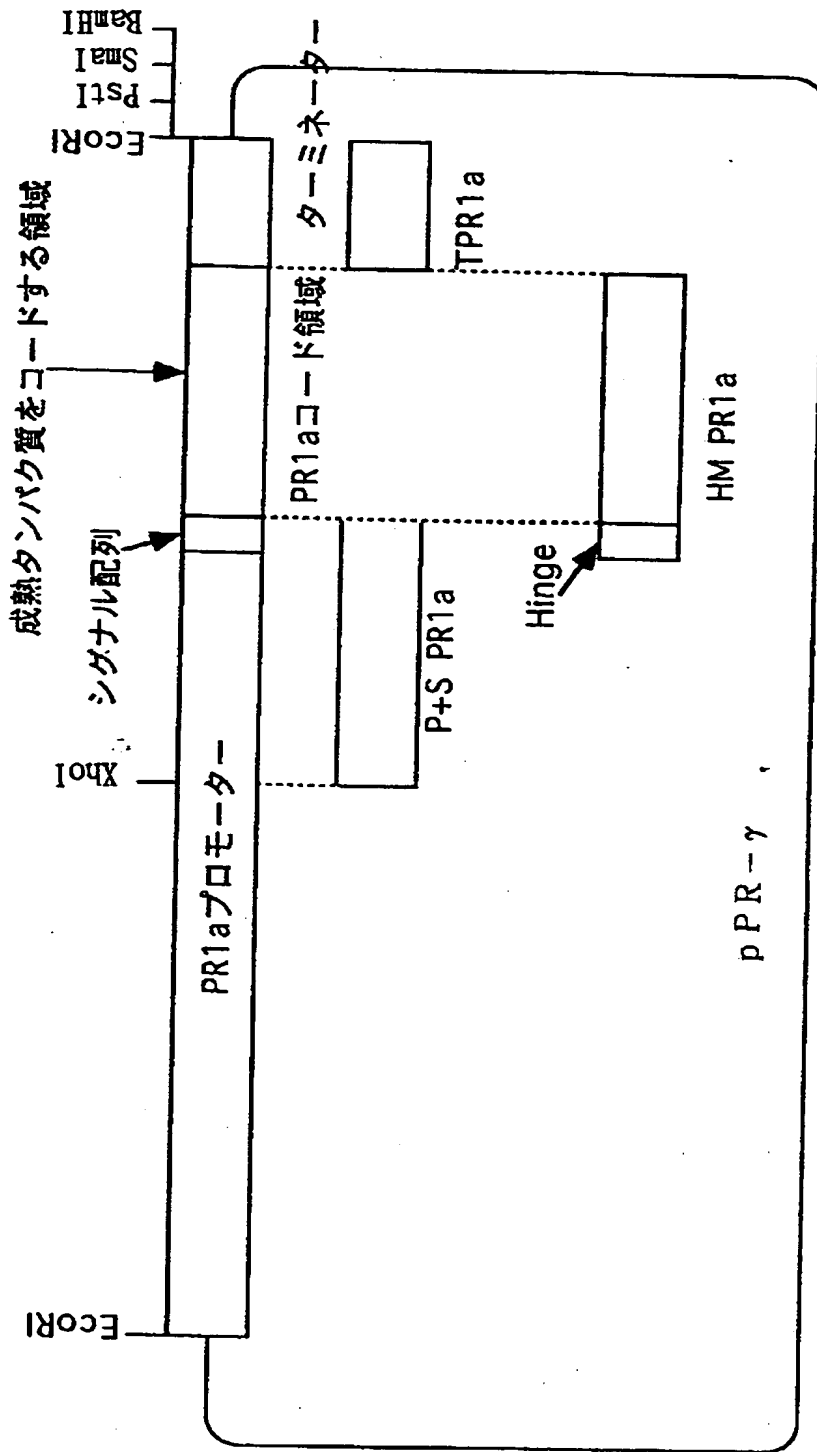
【図10】 試験管内におけるSarcotoxin1aの抗-Rhizoctonia solani AG-4 1272(抗ホウレンソウ株腐病菌)試験の結果を示す。

【図11】 試験管内におけるSarcotoxin1aの抗-Rhizoctonia solani(抗キュウリ苗立ち枯れ病菌)試験の結果を示す。

【図12】 形質転換された植物のPhytophthora infestans(疫病菌)抵抗性を示す図である。

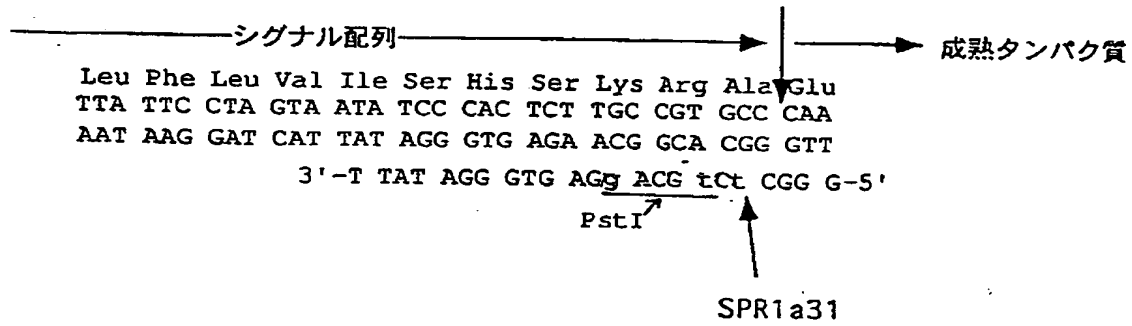
【書類名】 図面

【図1】



【図2】

PR1a遺伝子の配列の一部（シグナル配列の3'端周辺）



小文字の塩基が変異を導入した部分

【図3】

TPR1a51のプライマー配列

Sarcotoxin遺伝子の一部（成熟型ペプチドのC末端をコードする領域）

Ala Ala Thr Ala Arg Gly ***
5'-GCT GCT ACA GCC AGA GGT TAA TTG AAA-3'

PR1a遺伝子の配列の一部（成熟型タンパク質のC末端をコードする領域）

Pro Tyr ***
5'-CCA TAC TAA TTG AAA CGA CCT ACG TCC ATT-3'

5'-GCT GCT ACA GCA CGT GGT TAA TTG AGC TCG AAA CGA CCT ACG TCC-3'

PmaCI

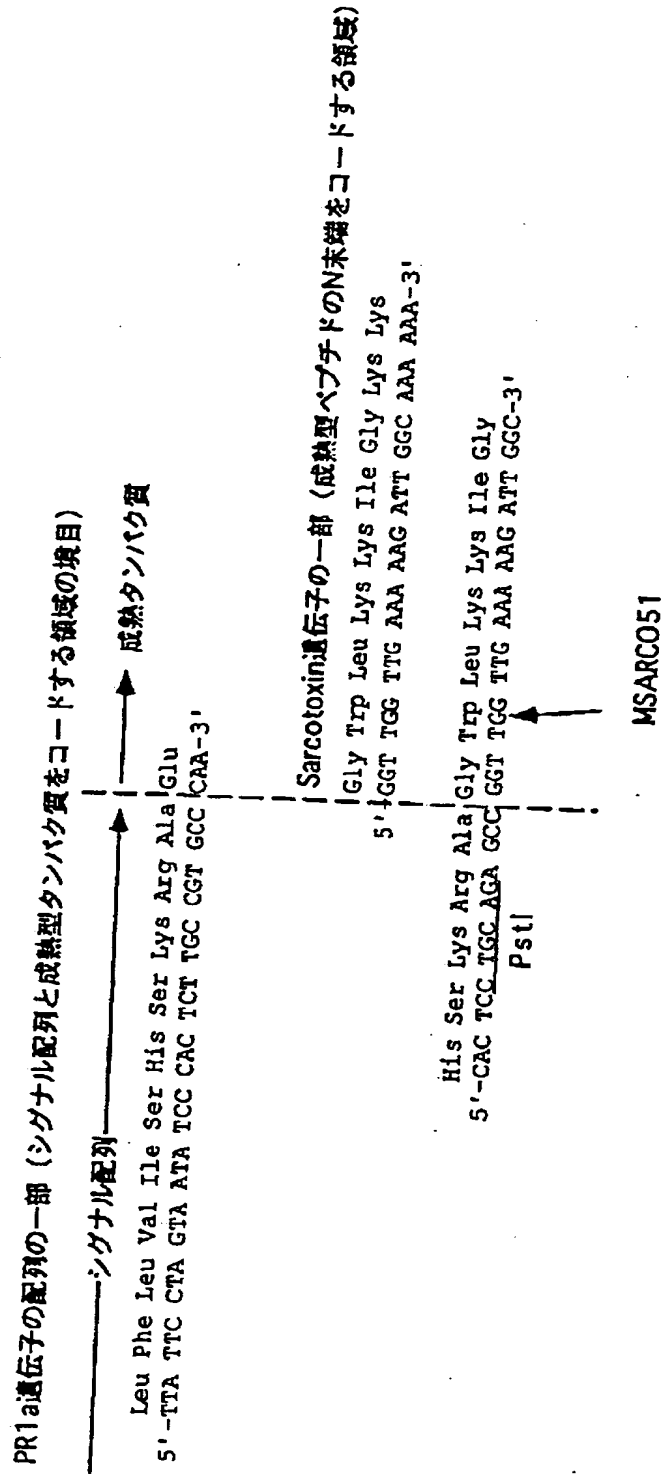
SacI



TPR1a51

【図4】

MSARCO51のプライマー配列



【図 5】

MSARCO31のプライマー配列

Sarcotoxin遺伝子の一部（成熟型ペプチドのC末端をコードする領域）

Ala Ala Thr Ala Arg Gly ***

5'-GCT GCT ACA GCC AGA GGT TAA TTG-3'

3'-CGA CGA TGT CGG TCT CCA ATT AAC-5'

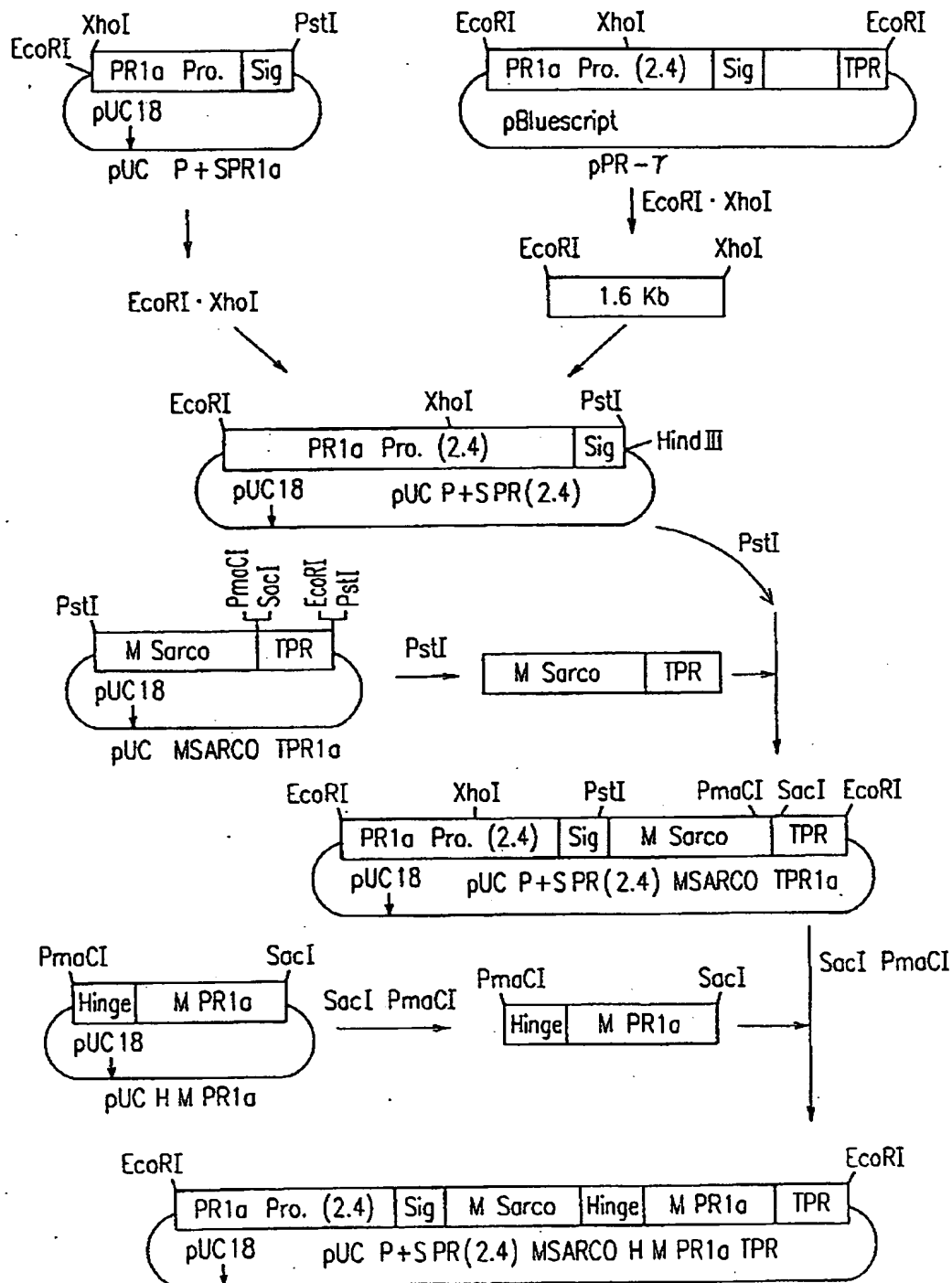
3'-CGA CGA TGT CGT GCA CCA ATT AAC TCG AGC TTT-5'

PmaCI

SacI

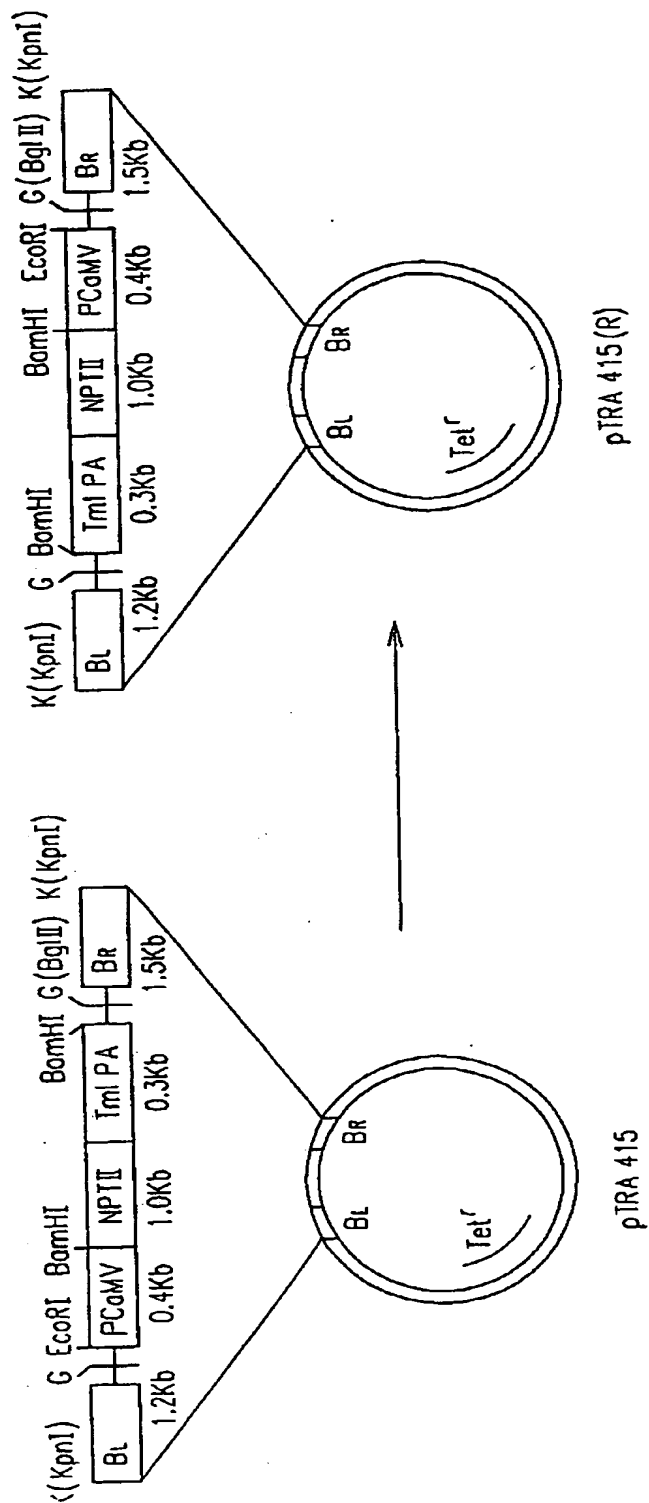
MSARCO31

【図6】

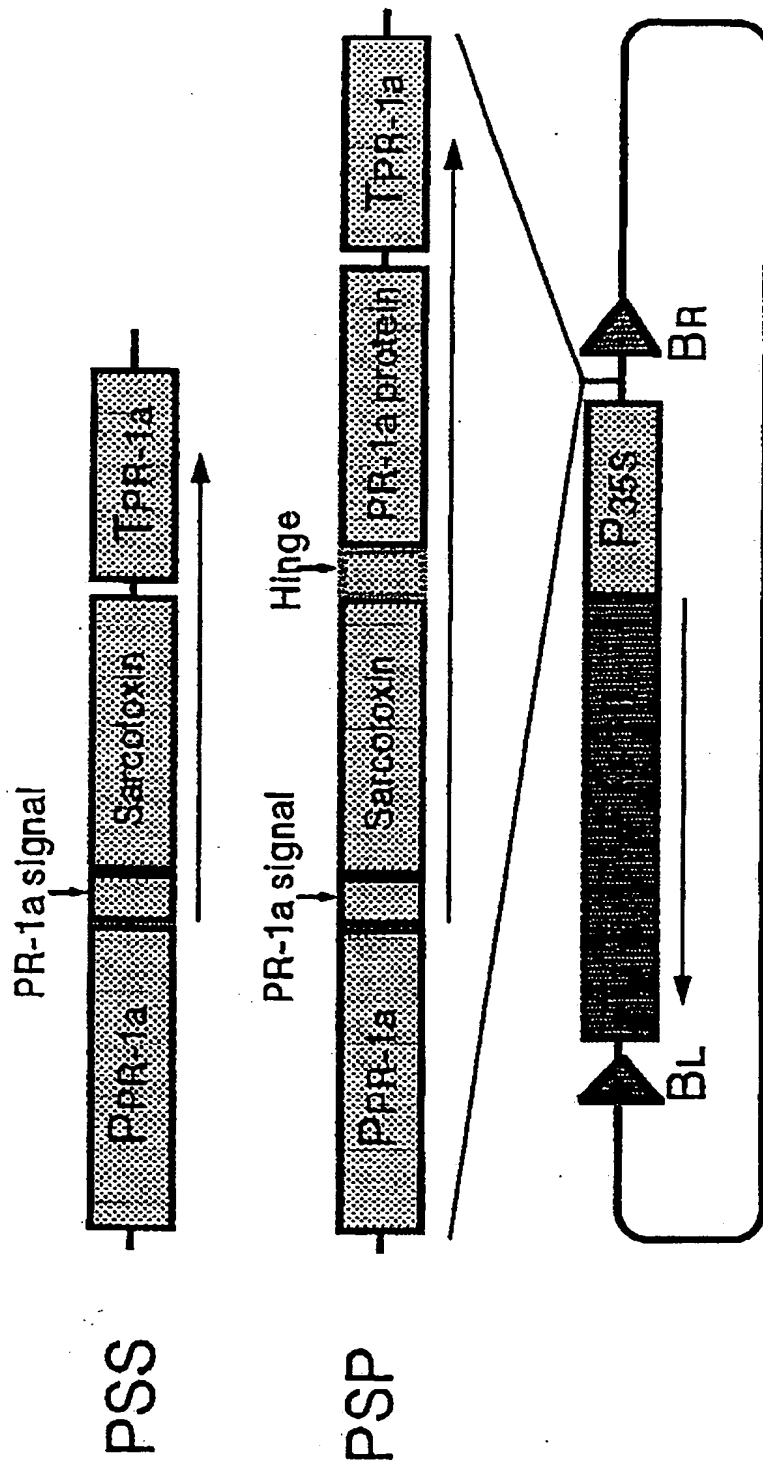


【図7】

バイナリーベクター pTRA 415 の方向を変える



【図8】

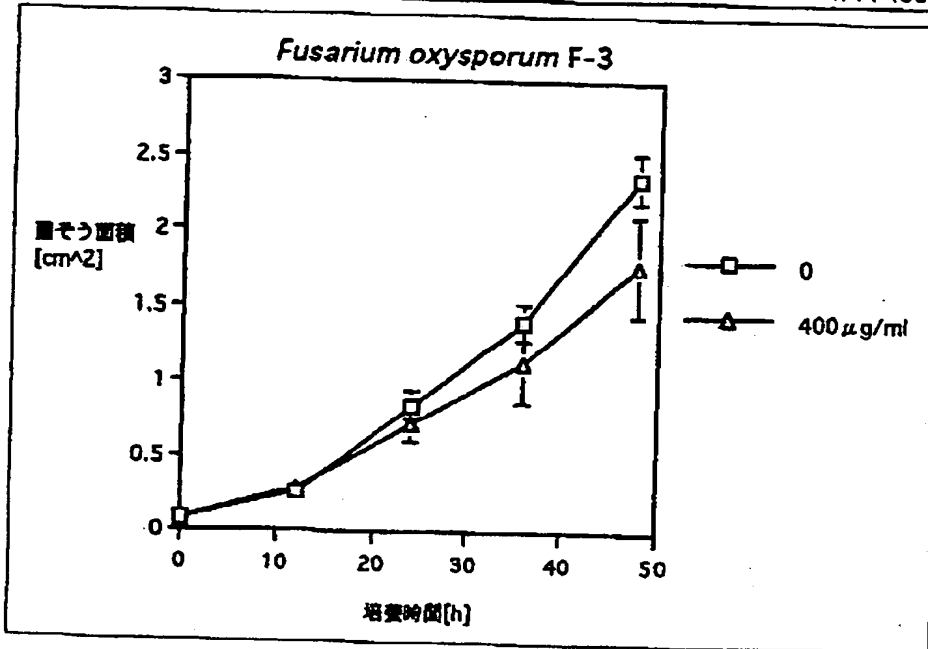


【図9】

F.oxv.F-3						
ザルコ添加量 μg/ml	培養時間[h]					
	0	12	24	36	48	
0	0.0707828	0.283131	0.786475	1.3291428	2.2729128	
0	0.0707828	0.1966188	0.786475	1.3291428	2.2729128	
0	0.0707828	0.283131	0.9516348	1.541491	2.548179	
50	0.0707828	0.283131	0.786475	1.7695688	2.548179	
50	0.0707828	0.283131	0.786475	1.541491	2.2729128	
50	0.0707828	0.1966188	0.503344	1.132524	1.7695688	
200	0.0707828	0.283131	0.786475	1.541491	2.2729128	
200	0.0707828	0.1966188	0.503344	0.9516348	1.7695688	
400	0.0707828	0.283131	0.786475	1.3291428	2.013376	
400	0.0707828	0.283131	0.6370448	0.9516348	1.541491	

標準偏差						
ザルコ添加量 μg/ml	培養時間[h]					
	0	12	24	36	48	
0	0	0.0499479	0.095355	0.1225993	0.158925	
50	0	0.0499479	0.1634658	0.3227743	0.3948334	
200	0	0.0611734	0.2002039	0.4170914	0.355918	
400	0	0	0.1056631	0.2669385	0.3336731	

平均						
ザルコ添加量 μg/ml	培養時間[h]					
	0	12	24	36	48	
0	0.0707828	0.2542936	0.8415283	1.3999255	2.3646682	
50	0.0707828	0.2542936	0.692098	1.4811946	2.1968868	
200	0.0707828	0.2398749	0.6449095	1.2465629	2.0212408	
400	0.0707828	0.283131	0.7117599	1.1403888	1.7774335	

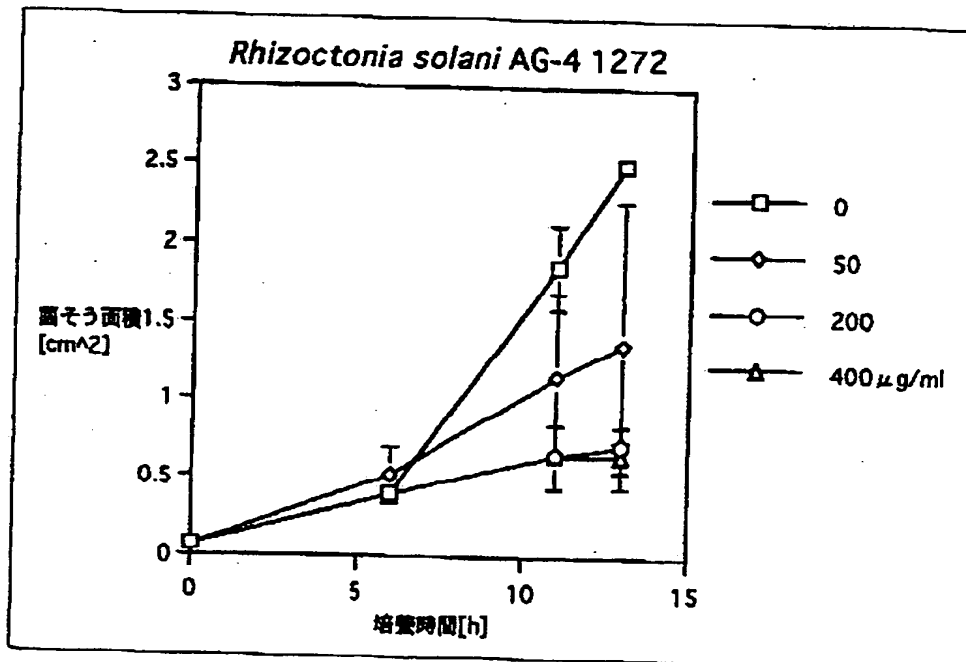


【図10】

R.sola.AG-4 1272					
ガルコ添加量 μg/ml		培養時間[h]			
		0	6	11	13
0	0.07078275	0.38537275	1.541491	2.548179	
0	0.07078275	0.38537275	2.013376	2.408579688	
0	0.07078275	0.38537275	2.013376	2.548179	
50	0.07078275	0.38537275	0.786475	0.709793688	
50	0.07078275	0.63704475	1.541491	2.013376	
200	0.07078275	0.38537275	0.503344	0.63704475	
200	0.07078275	0.38537275	0.786475	0.786475	
400	0.07078275	0.38537275	0.503344	0.568228188	
400	0.07078275	0.38537275	0.786475	0.709793688	

標準偏差					
ガルコ添加量 μg/ml		培養時間[h]			
		0	6	11	13
0	0	0	0.272442932	0.080597701	
50	0	0.177958978	0.533876934	0.921771893	
200	0	0	0.20020385	0.105663143	
400	0	0	0.20020385	0.100101925	

平均					
ガルコ添加量 μg/ml		培養時間[h]			
		0	6	11	13
0	0.07078275	0.38537275	1.856081	2.501645896	
50	0.07078275	0.51120875	1.163983	1.361584844	
200	0.07078275	0.38537275	0.6449095	0.711759875	
400	0.07078275	0.38537275	0.6449095	0.639010938	

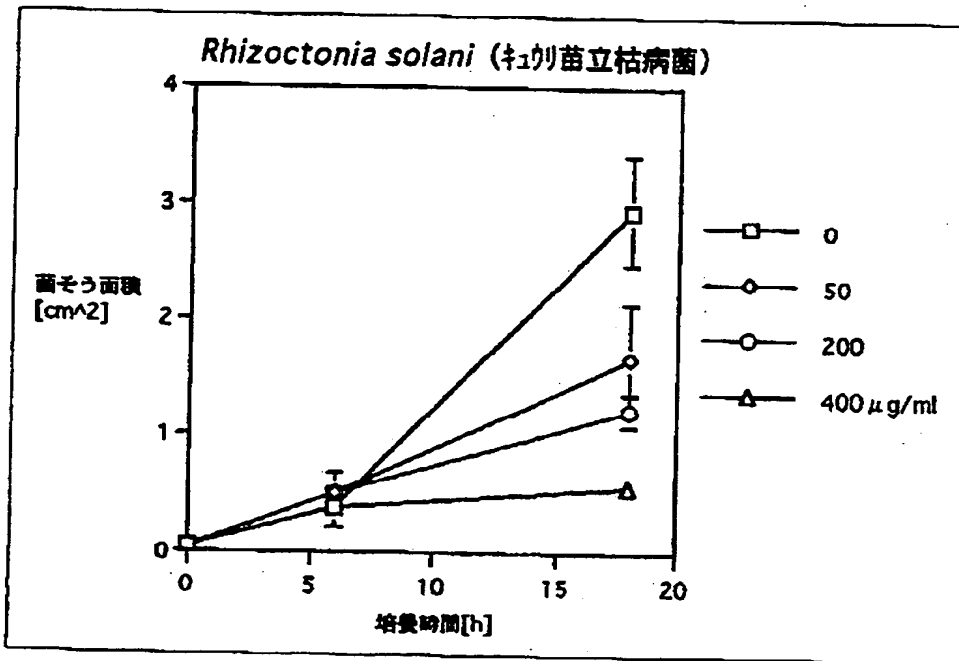


【図11】

R.sola.拮抗菌立枯病菌				
サルコ添加量		培養時間[h]		
$\mu\text{g/ml}$		0	6	18
0	0.07078275	0.38537275	2.83917475	
0	0.07078275	0.503344	3.46835475	
0	0.07078275	0.283131	2.548179	
50	0.07078275	0.503344	2.013376	
50	0.07078275	0.503344	1.32914275	
200	0.07078275	0.38537275	1.132524	
200	0.07078275	0.63704475	1.32914275	
400	0.07078275	0.283131	0.503344	
400	0.07078275	0.503344	0.63704475	

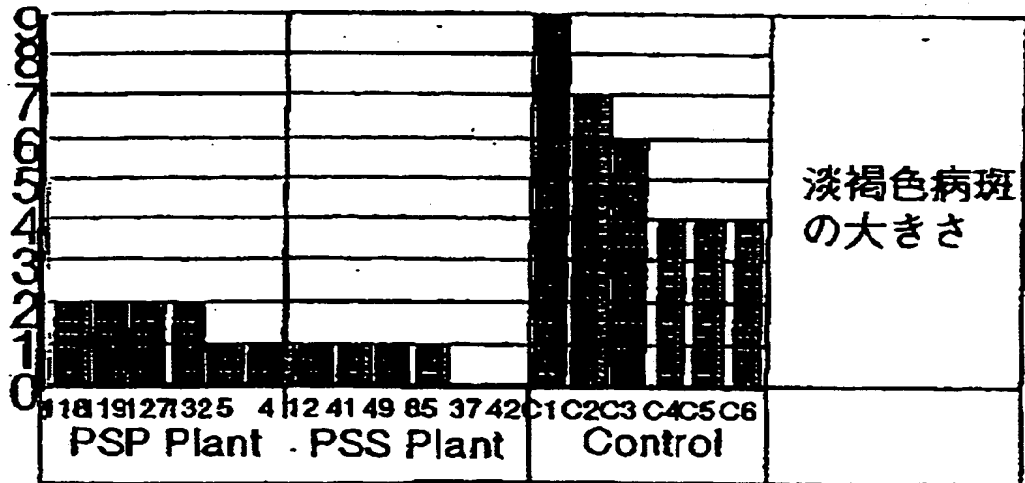
標準偏差				
サルコ添加量		培養時間[h]		
$\mu\text{g/ml}$		0	6	18
0	0	0.110200088	0.470331339	
50	0	0	0.483825971	
200	0	0.177958978	0.139030451	
400	0	0.155714106	0.094540707	

平均				
サルコ添加量		培養時間[h]		
$\mu\text{g/ml}$		0	6	18
0	0.07078275	0.390615917	2.951902833	
50	0.07078275	0.503344	1.671259375	
200	0.07078275	0.51120875	1.230833375	
400	0.07078275	0.3932375	0.570194375	



【図12】

Sarcotoxin1a遺伝子導入タバコで検出された
Phytophthora infestans(疫病菌)抵抗性



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 病原菌に対して抵抗性のある植物を提供すること

【解決手段】 抗細菌性ペプチドであるsarcotoxin1 aをコードする遺伝子を植物に導入し、病原糸状菌抵抗性植物を作成する。

【選択図】 なし

特平 8-187763

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[591127076]

1. 変更年月日	1991年 5月16日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県つくば市観音台2丁目1の2
氏 名	農林水産省農業生物資源研究所長